



## Molecular mechanism of B cell activation through GANP molecule

Satoru FUJIMURA, Kazuhiko KUWAHARA, and Nobuo SAKAGUCHI

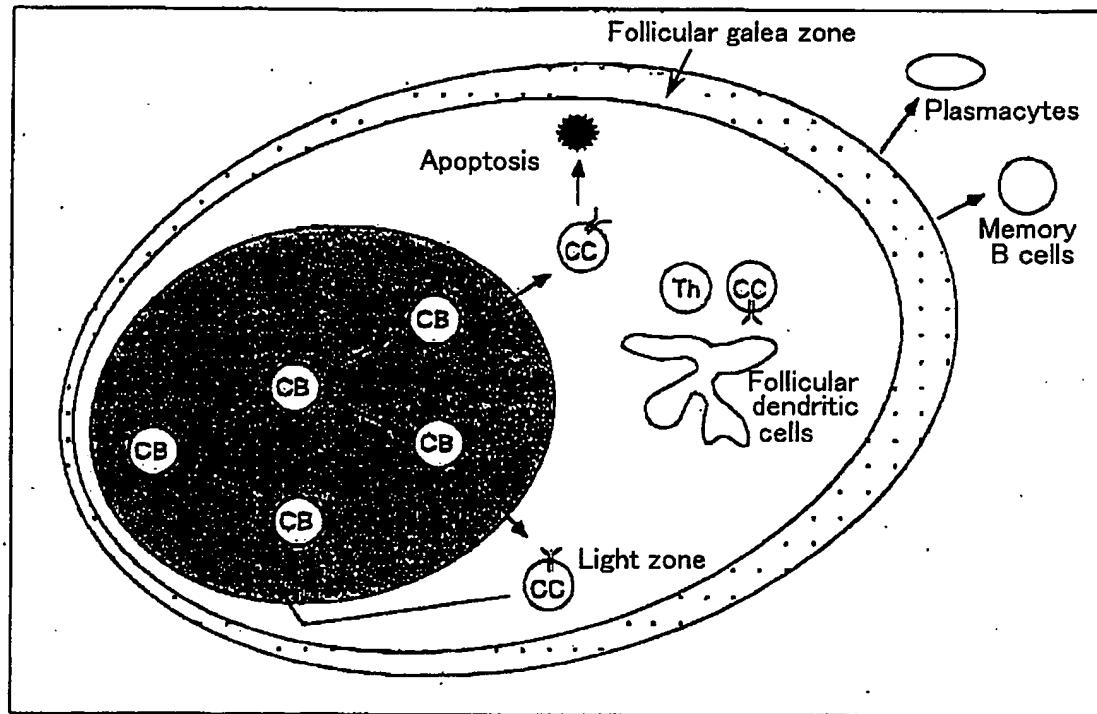
### Introduction

When a foreign antigen invades a living body, antigen-specific B cells recognize invasion of the antigen, and the cells then differentiate into plasmacytes that generate an antigen-specific antibody. This action of the antigen-specific B cells is extremely important for biological defense. B cells, which got mature in the bone marrow and transferred to peripheral tissues, generate an antibody having a high affinity for a T cell-dependent antigen. During this process, it has been known that a germinal center plays an important role in peripheral lymphatic tissues. When antigen-specific B cells recognize an antigen, in order to generate a sufficient number of antigen-specific B cells, a rapid growth of such antigen-specific B cells is induced in a lymph follicle. At the time, growing cells act as centroblasts and form the dark zone of the germinal center. Thereafter, such centroblasts transfer to a light zone, and they differentiate into centrocytes whose cell cycle is terminated. During this process, somatic hypermutation occurs at a high frequency, and the cells have a higher affinity for a foreign antigen (Figure 1). A class switch from an IgM antibody to an IgG antibody also occurs in this region, and it is closely associated with affinity maturation of an antibody<sup>1)</sup>.

The molecular mechanism of B cell activation in such a germinal center has not yet been clarified. AID (activation-induced cytidine deaminase) is an RNA editing enzyme that is induced during a class switch. It has been reported that such an AID-deficient mouse does not have two mechanisms, namely, somatic hypermutation in a germinal center and a class switch<sup>2)</sup>. Moreover, with regard to induction of V region mutagenesis, several new DNA polymerases are so-called error-prone polymerases, which cause low accuracy of incorporation of nucleic acid, and thus a relation between such enzymes and somatic hypermutation has been suggested<sup>3)</sup>. These findings demonstrate that the studies of this region, which had been mainly dedicated to the analysis of a communication pathway causing affinity maturation, have finally proceeded to the stage of clarification of somatic hypermutation and the molecular

mechanism of a class switch.

DNA primase is necessary as a DNA replication enzyme that is a molecule acting together with DNA polymerase. It has been revealed that novel DNA primase is present in germinal center B cells. It has been suggested that such novel DNA primase be likely to interact with molecules associated with affinity maturation. In this paper, the relationship of such novel DNA primase, GANP, with a B cell activation mechanism will be described based on the current findings.



**Figure 1** Model of maturation of B cells in germinal center

When antigen-specific B cells are activated with an antigen, the cells become centroblasts, and they actively repeat cell division in the dark zone of a germinal center. At that time, somatic hypermutation is considered to occur at a high frequency. Thereafter, the centroblasts differentiate into centrocytes, and the centrocytes are then stimulated with follicular dendritic cells or helper T cells in a light zone. At that time, only B cells, which express a high-affinity antigen receptor, are selected, and the thus selected B cells then differentiate into antibody-generating cells or memory B cells. On the other hand, low-affinity B cells are eliminated as a result of apoptosis. In addition, it is considered that several cells are returned to centroblasts, and that they

cause high-frequency somatic hypermutation again.

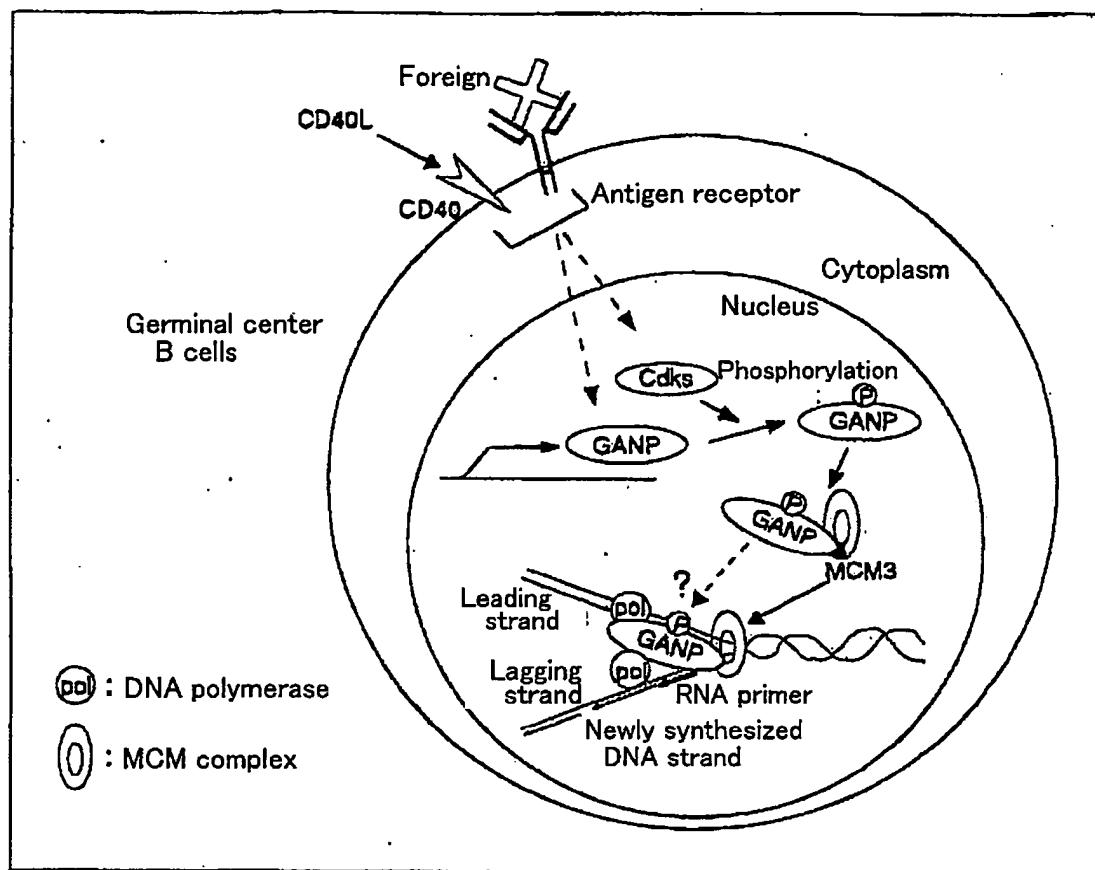
CB: centroblast; CC: centrocyte; and Th: helper T cells

### Signal to GANP activation

Expression of a GANP protein increases selectively on germinal center B cells. That is, this demonstrates that primase activity is induced by stimulation and that it appears. This primase clearly differs from p49 primase that exists in a wide range of cells. For the purpose of analyzing the type of control of induction of GANP primase during activation of B cells, phosphorylation of GANP was examined using various types of kinases. As a result, we found that GANP is phosphorylated by cyclin dependent kinases (Cdks) *in vitro*. The serine residue at position 502 (<sup>502</sup>Ser) existing in the GANP primase domain shows a consensus sequence of phosphorylation by Cdks. When the <sup>502</sup>Ser was substituted with Ala that is a non-phosphorylated mutant, primase activity was lost. In contrast, when the <sup>502</sup>Ser was substituted with Glu that indicates a pseudo-phosphorylated state, high primase activity was exhibited <sup>9)</sup>. From such analyses, it became clear that the primase activity of GANP is strictly controlled by phosphorylation of the <sup>502</sup>Ser.

Moreover, in order to confirm that the GANP primase activity is stimulus-dependent, a monoclonal antibody specific for <sup>502</sup>Ser-phosphorylated GANP was produced. In terms of expression of GANP in splenic B cells *in vitro*, a comparison was made by the immunostaining method. As a result, neither an anti-GANP antibody nor an anti-phosphorylated GANP antibody was stained, when GANP was not stimulated. However, when GANP was stimulated with an anti-CD40 antibody or LPS, expression of GANP was induced. Moreover, such an anti-CD40 antibody also induced a significant increase in phosphorylated GANP, but such a reaction was not observed by stimulation with LPS. These results suggested that stimulation with CD40 be required for phosphorylation of <sup>502</sup>Ser. Subsequently, the occurrence of phosphorylation of GANP in germinal center B cells after antigenic stimulation was examined. When a mouse was immunized with TNP-KLH as a T cell-dependent antigen, it was found that phosphorylation of <sup>502</sup>Ser of GANP increased as expression of GANP increased in the splenic germinal center B cells <sup>49)</sup>. These results demonstrated that antigenic stimulation induces expression of GANP, and that GANP primase activity is increased by stimulation with CD40/CD40L.

As a result of the analysis of CD40-deficient mice, it has been well known that the action of CD40 is necessary for formation of a germinal center or a class switch <sup>11)</sup>. The fact that expression of GANP and an increase in the primase activity thereof are induced by stimulation with CD40 suggests that GANP plays an important role in the process of affinity maturation of B cells in the germinal center.



**Figure 3** Expression of GANP in germinal center B cells and model of control of cell growth

B cells, which have recognized a T cell-dependent antigen, transfer a signal via CD40L and CD40 on helper T cells. Thereby, an increase in GANP expression and phosphorylation of GANP via Cdks are induced. Phosphorylated GANP acts together with other relevant molecular groups such as DNA polymerase or an MCM complex in the nucleus, and efficiently synthesizes an RNA primer in the lagging strand, thereby supporting rapid DNA replication.

## Conclusion

GANP has two relevant functions as novel DNA primase and a molecule associated with MCM3. Since this primase activity is induced by antigenic stimulation, when B cells rapidly proliferate, a sufficient amount of primer cannot be supplied by pola-p49 primase, and thus it is considered that novel primase of B cells supports rapid DNA replication (Figure 3).

A primase domain and a Map-box domain exist in an extremely restricted region. Otherwise, a GANP-specific functional domain further exists, and it may play an unknown role. With regard to B cells, a change in the cellular localization of GANP or a functional change due to phosphorylation may play an important role. It is considered that the analysis of GANP and the function thereof in DNA replication will clarify a detailed process from affinity maturation in B cells to generation of an antibody, and that the aforementioned analysis will also lead to various aspects such as cell differentiation in higher mammalian cells, DNA replication, or DNA repair, other than its functions in B cells.

## 特集II B細胞シグナルに関する最近の進歩

GANP分子による  
B細胞活性化の分子機構\*藤村 瞳\*\*  
桑原 一彦\*\*  
阪口 薫雄\*\*

Key Words : germinal center, DNA primase, CD40, DNA replication

## はじめに

生体内に外来抗原が侵入してきた際、抗原特異的B細胞がそれを認識し、その後抗原特異的抗体を産生する形質細胞に分化することは、生体防御の上できわめて重要である。骨髓中で成熟し末梢に移動してきたB細胞が、T細胞依存性抗原に対して親和性の高い抗体を産生していく過程で、末梢リンパ組織における胚中心(Germinal Center)が重要な役割を担っていることが知られている。抗原特異的なB細胞が抗原を認識すると、リンパ滤胞において充分な数の抗原特異的B細胞を産生するための急速な増殖が誘導される。この時増殖している細胞はセントロblastとして、胚中心の暗帯を形成する。ついでセントロblastは明帯に移動し、細胞周期の停止したセントロサイトに分化する。この間に体細胞突然変異(somatic hypermutation)が高頻度に起こり、外来抗原に対して親和性をより強く有するようになる(図1)。IgM抗体からIgG抗体へのクラススイッチもこの領域で起こり、抗体の親和性の成熟(affinity maturation)と密接に関連している<sup>1)</sup>。

この胚中心におけるB細胞活性化の分子機構

についてはいまだ解明されていない。クラススイッチの際に誘導されるRNA editing enzymeであるAID(activation-induced cytidine deaminase)の欠損マウスでは、胚中心における体細胞突然変異とクラススイッチの2つの機構が欠失すると報告された<sup>2)</sup>。さらに、V領域突然変異誘導に関して、新規DNAポリメラーゼのいくつかは核酸の取り込みの正確性が低い、いわゆる誤りがち(error-prone)ポリメラーゼであり、これらの酵素と体細胞突然変異との関連が示唆されている<sup>3)</sup>。これらの知見は、ともすれば主体であった親和性の成熟をひき起こすための伝達経路の解析から、この領域の研究がいよいよ体細胞突然変異とクラススイッチそのものの分子メカニズムの解明へと発展してきたことを示している。

DNA複製酵素系でDNAポリメラーゼと協調して作用する分子としてDNAプライマーゼが必要である。胚中心B細胞では新規のDNAプライマーゼが存在することが明らかになり、親和性の成熟に関連したこれらの分子と相互作用している可能性が示唆されている。本稿ではこの新しいDNAプライマーゼGANPとB細胞の活性化機構との関連について最近の知見を中心に述べる。

## 胚中心関連分子GANPの同定と構造

われわれは胚中心で行われている分化誘導のメカニズムを解明する目的で、胚中心で選択的

\* Molecular mechanism of B cell activation through GANP molecule.

\*\* Satoru FUJIMURA, M.D., Kazuhiko KUWAHARA, M.D. & Nobuo SAKAGUCHI, M.D.: 熊本大学医学部免疫学(〒860-0811 熊本市本荘2-2-1); Department of Immunology, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 860-0811, JAPAN

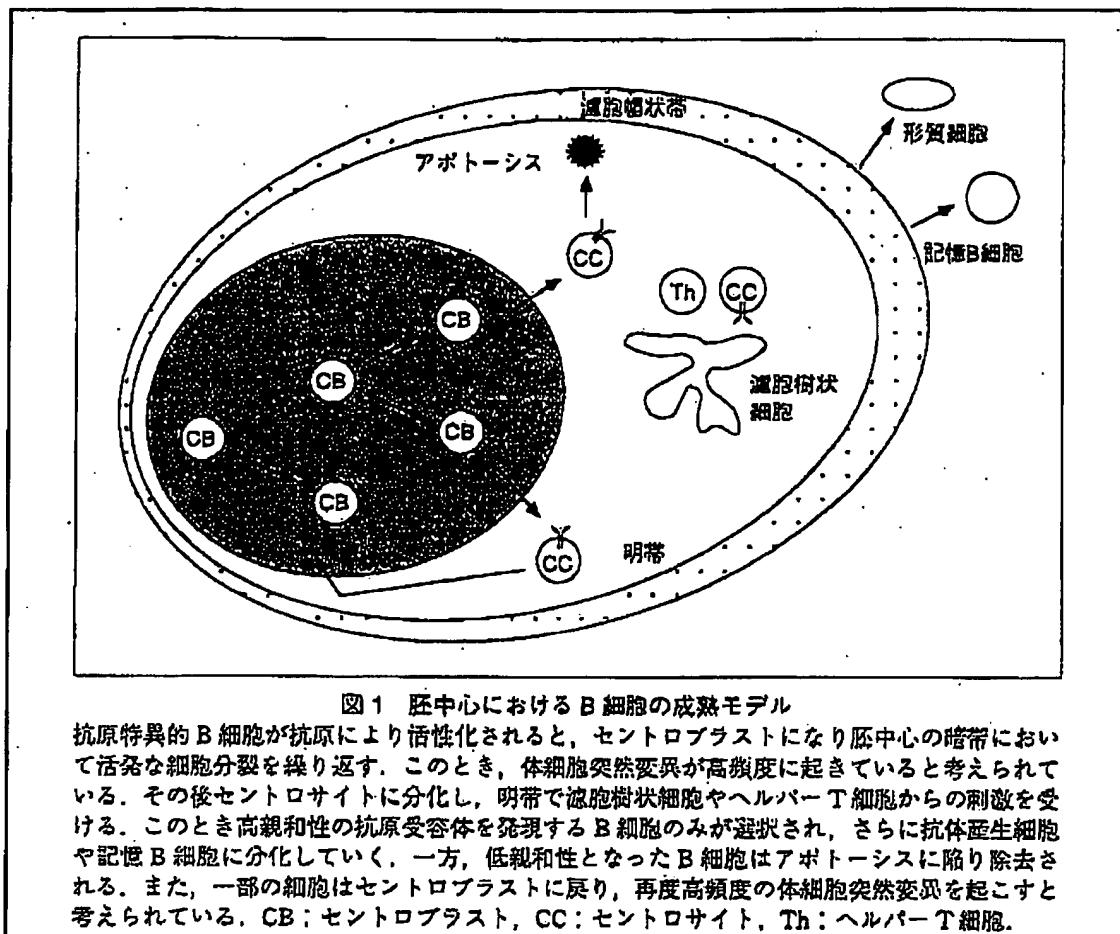


図1 胚中心におけるB細胞の成熟モデル

抗原特異的B細胞が抗原により活性化されると、セントロblastになり胚中心の暗帯において活発な細胞分裂を繰り返す。このとき、体細胞突然変異が高頻度に起きていると考えられている。その後セントロサイトに分化し、明帯で滤胞樹状細胞やヘルパーT細胞からの刺激を受ける。このとき高親和性の抗原受容体を発現するB細胞のみが選択され、さらに抗体産生細胞や記憶B細胞に分化していく。一方、低親和性となったB細胞はアポトーシスに陥り除去される。また、一部の細胞はセントロblastに戻り、再度高頻度の体細胞突然変異を起こすと考えられている。CB:セントロblast, CC:セントロサイト, Th:ヘルパーT細胞。

あるいは特異的に発現が上昇する分子の同定を試みた。マウスB細胞株WEHI-231の可溶化物をラットに免疫し、樹立した多数のハイブリドーマの培養上清を用いて、マウスの腸管のバイエル板を免疫染色した。その結果、この中の1つの抗体が胚中心、とくにセントロサイトを強く染めることがわかった。そこで抗体スクリーニングによってこの抗体が認識する分子をコードする遺伝子 $ganp$ を単離した<sup>4)</sup>。

$GANP$ は1,971アミノ酸からなり、2か所の核移行シグナルとコイルドコイル領域を認め、核内分子であることが示唆された(図2)。また核内コアクチベーターによくみられるLXXLL配列を4か所有していた。われわれはまた、ヒト $GANP$ の構造も決定したが、C末端側721アミノ酸の配列はヒトMap80と完全に一致しており、210kDaの $GANP$ と80kDaのMap80はalternative splicingによって得られる同一遺伝子由来の分子であることを明らかにした<sup>5)</sup>。この2種類の蛋白は、ともにDNA複製に必須の分子であるMCM3との結合

ドメインを有している。

### 胚中心における $GANP$ の機能

#### 1. DNA複製関連分子MCM3との結合

出芽酵母の解析から発見されたminichromosome maintenance(MCM)は、真核生物に広く存在し、MCM2-7からなる安定なヘテロ6量体を細胞内で形成している。このMCM複合体がクロマチン上の複製開始複合体に結合することが、後期G1期からS期にかけてDNA複製を行うために必須であることがわかっている。これはMCM複合体の有するヘリカーゼ活性が複製開始に必要であるためと考えられている。DNA複製後、MCM複合体がクロマチンから離れ核外へ輸送されることによって、1回の細胞周期で起こるDNA複製は1回だけに抑えられ、分裂してきた娘細胞が適切なDNA量をもつことが保証されると考えられている<sup>6)</sup>。

$ganp$ 遺伝子のshort formであるMap80はMapboxと呼ばれるドメインを介してMCM3と結合し、

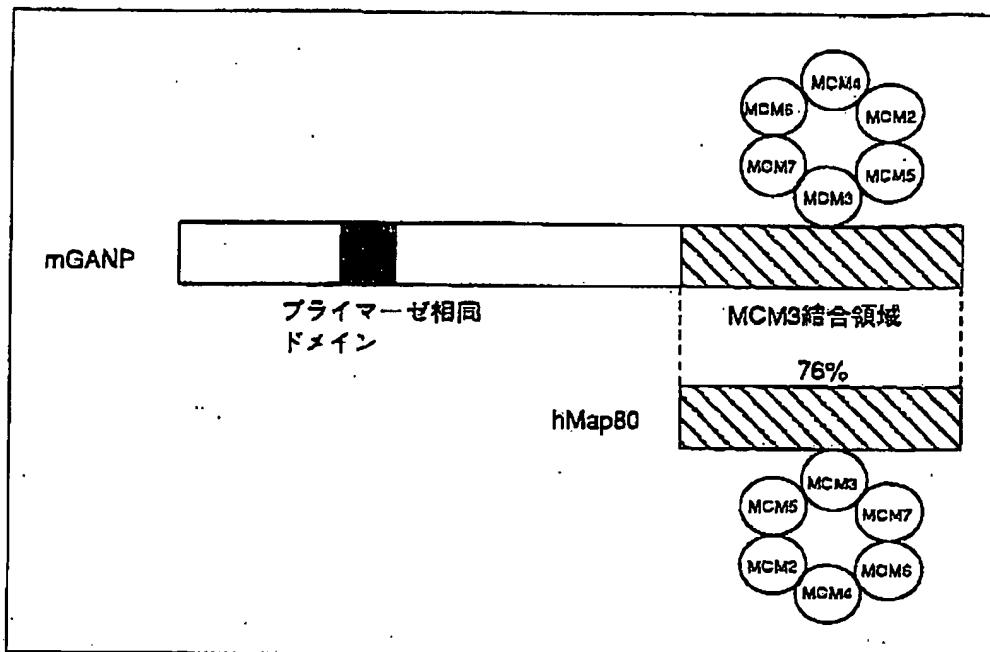


図2 マウスGANP分子の構造

マウスGANPのプライマーゼドメインは、マウスp49の171番目から301番目のアミノ酸の領域と相同意性が認められる。ヒトMap80はヒトGANPのalternative splicingによって得られる産物で、MCM3のimport factorとして知られている。MCM3はDNAヘリカーゼ活性を有するMCM複合体を構成する蛋白で、マウスGANPもこのMap80相同領域でMCM3と結合する。

核内輸送因子として働く可能性が報告されている<sup>7,8)</sup>。そこでGANPとMCM3との共沈実験を行ったところ、予想されたとおりGANPもMCM3と会合することが確かめられた<sup>9)</sup>。このことは、B細胞の急速な増殖の際のDNA複製において、GANPもなんらかの働きを果たしていることを示唆している。

## 2. 新規DNAプライマーゼ<sup>9)</sup>

最近われわれは、GANP蛋白の414番目から550番目のアミノ酸にわたる領域が、DNAポリメラーゼ $\alpha$  (pol $\alpha$ )と結合するDNAプライマーゼp49と相同意性があることを見出した。p49はこれまでに知られている唯一のDNAプライマーゼで、p49, p58, p180からなるpol $\alpha$ 複合体は、DNA複製の際に不連続なDNA伸長で知られる遡行(ラギング)鎖の合成に関与していることが知られている<sup>10)</sup>。

そこで実際にGANPがDNAプライマーゼ活性を有しているのかどうか調べるために、GANPのプライマーゼドメインのリコンビナント蛋白を用いてプライマーゼアッセイを行った。このリコンビナント蛋白を、NTP, dNTP, [<sup>3</sup>H]-dTTP, 1本鎖DNAとDNAポリメラーゼであるpol I Klenow

fragmentの存在下で反応させると、dTTPのDNAへの取り込み、すなわちDNA合成が認められた。この合成反応は、GANPリコンビナントもしくはpol Iの非存在下では認められなかった。このことはすなわち、1本鎖DNAに対してGANPのプライマーゼドメインが実際にRNAプライマーを合成しており、これによってpol IのDNA合成が可能になったことを示している。

プライマーゼが活性化している状況下では、細胞内のDNA含量が増加することが予想される。そこでヒトB細胞株であるDaudiに $ganp$  cDNAを導入しGANP蛋白を過剰発現させたところ、実際にDNA含量は対照群よりも明らかに増加していることがわかった<sup>9)</sup>。これらのことからGANPプライマーゼ活性は、急速に増殖する細胞においてDNA合成を助けていることが考えられる。

## GANP活性化へのシグナル

GANP蛋白は胚中心B細胞で選択的に発現上昇している。つまり、プライマーゼ活性が刺激によって誘導され出現していくということを示しており、広くどの種の細胞にも存在するp49ブ

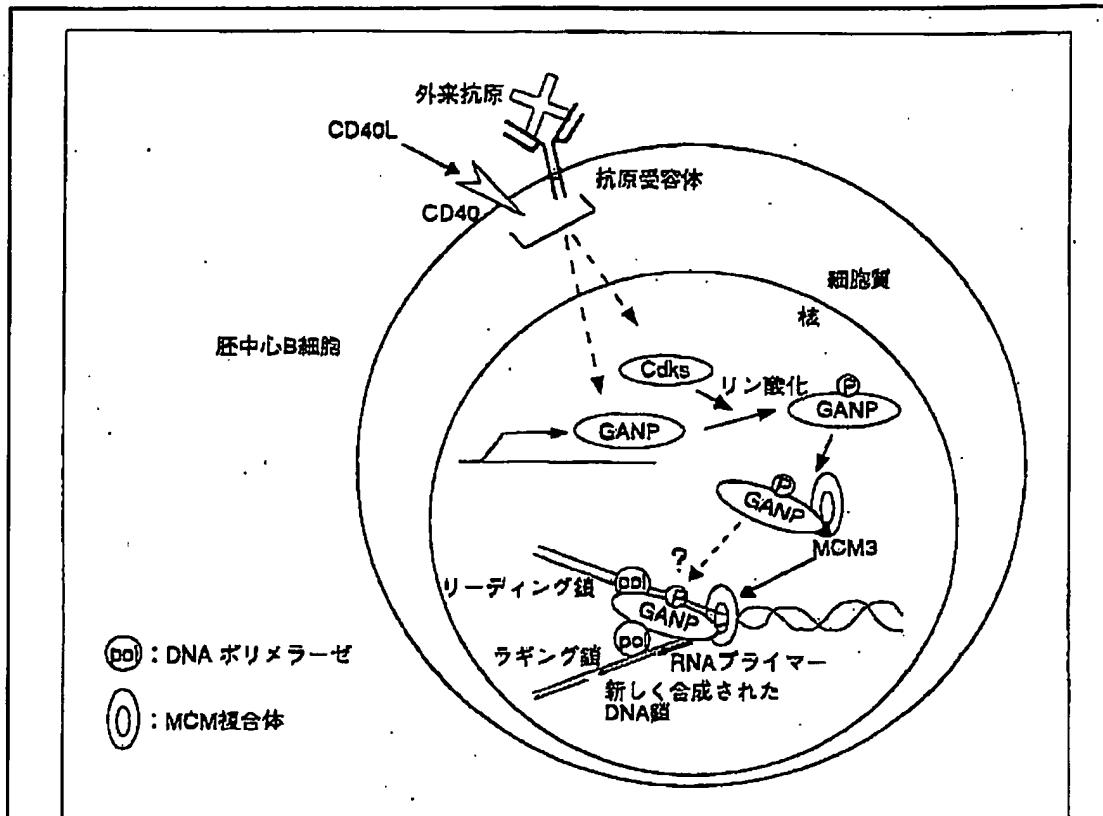


図3 脾中心B細胞におけるGANPの発現と細胞増殖制御のモデル

T細胞依存性抗原を認識したB細胞は、ヘルパーT細胞上のCD40LからCD40を介してシグナルを伝えられる。これによってGANPの発現上昇およびCdksを介したGANPのリン酸化が誘導される。リン酸化GANPは核内においてDNAポリメラーゼやMCM複合体といった他の関連分子群と協調し、ラギング鎖のRNAプライマーを効率よく合成することで、急速なDNA複製の実行を助けているものと考えられる。

ライマーーゼとは明らかに異なる。B細胞が活性化された際にどのようにGANPプライマーーゼが誘導の制御をうけているのかを解析する目的で、さまざまなキナーゼによるGANPのリン酸化を調べた。その結果、われわれはcyclin dependent kinases (Cdks)がin vitroにおいてGANPをリン酸化することを見出した。GANPのプライマーーゼドメイン中に存在する502番目のセリン残基(<sup>502</sup>Ser)は、Cdksによるリン酸化のコンセンサス配列を示している。この<sup>502</sup>Serを非リン酸化変異であるAlaへ置換するとプライマーーゼ活性が消失した。逆にこのSerを擬似的なリン酸化状態を意味するGluに置換すると、高いプライマーーゼ活性が示された<sup>9</sup>。これらの解析からGANPのプライマーーゼ活性が<sup>502</sup>Serのリン酸化によって厳密に制御されていることが明らかとなった。

さらにGANPのプライマーーゼ活性が刺激依存性

であることを確かめるため、<sup>502</sup>Serのリン酸化型GANPに特異的なモノクローナル抗体を作製した。In vitroにおいて脾臓B細胞のGANPの発現を免疫染色で比較すると、非刺激時では抗GANP抗体、抗リン酸化GANP抗体ともに染まらないが、抗CD40抗体もしくはLPSで刺激するとGANPの発現が誘導された。また抗CD40抗体は著明なリン酸化GANPの上昇も誘導したが、LPS刺激ではこの反応はみられなかった。このことから、<sup>502</sup>Serのリン酸化にはCD40からの刺激が必要であることが示唆された。次に抗原刺激後の脾中心B細胞においてこのGANPのリン酸化が起こるかどうかを調べた。T細胞依存性抗原であるTNP-KLHでマウスを免疫すると、脾臓の脾中心B細胞においてGANPの発現が上昇するのに伴ってGANPの<sup>502</sup>Serのリン酸化も上昇することがわかった<sup>10</sup>。これらのことから抗原刺激はGANPの発現を誘導

し, GANPプライマーゼの活性型はCD40/CD40Lを介した刺激によって上昇することが示された。CD40に関してはその欠損マウスの解析などから, その作用が胚中心形成やクラススイッチに必要であることは, 以前からよく知られている<sup>11)</sup>。CD40刺激によってGANPの発現およびそのプライマーゼ活性の上昇が誘導されることは, 胚中心におけるB細胞の親和性の成熟の過程において, GANPが重要な役割を担っていることを示唆している。

### おわりに

GANPは新規DNAプライマーゼと, MCM3と会合する分子という2つの関連した機能を有している。このプライマーゼ活性は抗原刺激で誘導されることから, B細胞が急速に増殖する際, polα-p49プライマーゼでは充分な量のプライマーゼの供給が行えず, B細胞の新しいプライマーゼによって急速なDNA複製を助けていると考えられる(図3)。

プライマーゼドメインとMap-boxドメインは非常に限られた領域に存在しており, あるいはさらにGANP特有の機能ドメインがあり, それによって未知の役割を果たしているのかもしれない。B細胞に関しては, GANPの細胞局在の変化, あるいはリン酸化による機能の変化が重要な役割を果たしているのではないだろうか。GANPとそのDNA複製における機能の解析は, B細胞における親和性の成熟から抗体の産生にいたる詳細な過程を明らかにし, B細胞以外においても, 高等哺乳細胞における細胞分化, DNA複製と修復など多くの面につながっていくものと考えている。

### 文 献

- 1) MacLennan, I.C.M.: Germinal Centers. *Annu. Rev. Immunol.*, 12: 117, 1994.
- 2) Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., et al:

Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 102: 553, 2000.

- 3) Storb, U.: DNA polymerase in immunity: profiting from errors. *Nat. Immunol.*, 2: 484, 2001.
- 4) Kuwahara, K., Yoshida, M., Kondo, E., et al.: A novel nuclear phosphoprotein, GANP, is up-regulated in centrocytes of the germinal center and associated with MCM3, a protein essential for DNA replication. *Blood*, 95: 2321, 2000.
- 5) Abe, E., Kuwahara, K., Yoshida, M., et al.: Structure, expression, and chromosomal localization of the human gene encoding a germinal center-associated nuclear protein (GANP) that associates with MCM3 involved in the initiation of DNA replication. *Gene*, 255: 219, 2000.
- 6) Tye, B.-K.: The Mcm 2-3-5 proteins: Are they replication licensing factors? *Trends Cell Biol.*, 4: 160, 1994.
- 7) Takei, Y. & Tsujimoto, G.: Identification of a novel MCM3-associated protein that facilitates MCM3 nuclear localization. *J. Biol. Chem.*, 273: 22177, 1998.
- 8) Takei, Y., Swietlik, M., Tanoue, A., et al.: MCM3AP, a novel acetyltransferase that acetylates replication protein MCM3. *EMBO Rep.*, 2: 119, 2001.
- 9) Kuwahara, K., Tomiyasu, S., Fujimura, S., et al.: Germinal center-associated nuclear protein (GANP) has a phosphorylation-dependent DNA-primase activity that is up-regulated in germinal center regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98: 10279, 2001.
- 10) Arez, B. & Kuchta, R.D.: Eukaryotic DNA primase. *Trends Biochem. Sci.*, 25: 572, 2000.
- 11) Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., et al.: The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*, 1: 167, 1994.

\*

\*

\*